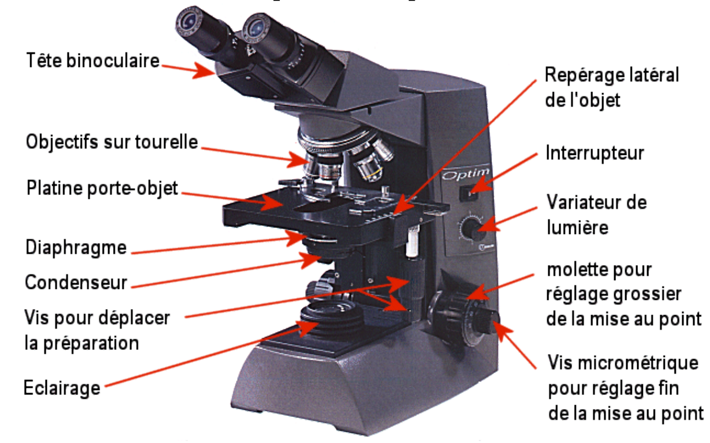
METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

Les principales méthodes et techniques dont dispose actuellement la biologie cellulaire sont reparties en trois aspects

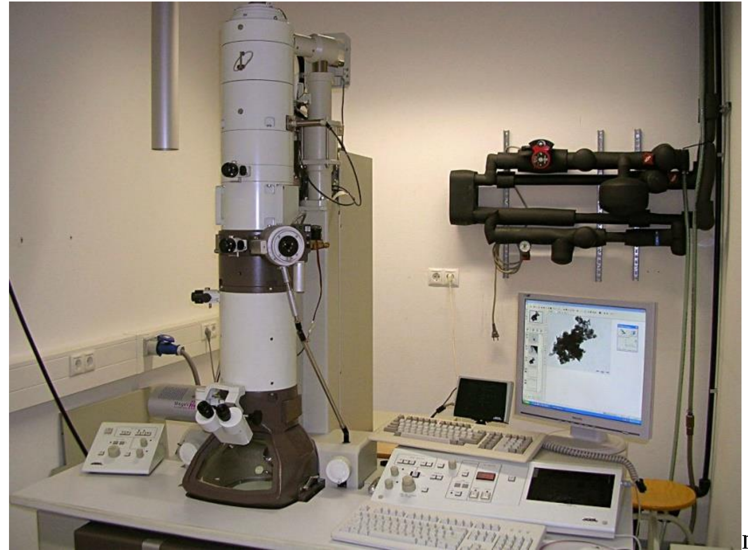
01 - Aspect morphologique :
Les méthodes optiques d'examen peuvent se pratiquer de deux manières :
- étude de cellules vivantes, soit directement dans l'organisme (examen vital) grâce à l'utilisation de colorants non nocifs ou vitaux, soit isolées à partir de fragments de tissus, examen supra vital.
- étude de cellules préalablement tuées suivant des méthodes diverses qui conservent leur morphologie et leur composition, dans un état aussi voisin que possible du vivant (fixation ou congélation)
Le plus couramment, les observations se font au microscope photonique ou au microscope électronique.

A - <u>Microscope photonique</u> : le pouvoir séparateur de l'œil humain est de l'ordre de 200µm à 25cm, l'œil ne peut distinguer que deux points voisins distants de 0,2mm environ, alors que la taille moyenne des cellules est bien inférieure (1à10µ pour une bactérie 10à30µpour une cellule animale ou végétale) , or au microscope photonique le pouvoir séparateur peut être abaissé à 0,2µ en lumière visible , et le grossissement maximal courant utilisable est de 1000fois (2000 à 2500 fois pour des appareils très perfectionnés) .
L'observation au microscope par transmission exige, pour que la lumière puisse traverser les objets, que ceux-ci soient de faible épaisseur (2 à 5µ environ) et convenablement contrastés
Les microscopes photoniques se prêtent mieux à une étude des tissus et de leur organisation générale (histologie) qu'a celle des cellules (cytologie), en effet en dehors du noyau les structures cytoplasmiques ne sont pas identifiables. Cependant les microscopes à lumière demeurent, par leur taille et leur prix, l'instrument de base le plus utilisé pour la recherche courante.



microscope photonique

B – <u>Microscope électronique</u> :
B 1 –<u>les microscopes à transmission</u> <u>(TEM)</u>
La microscopie électronique est la méthode de choix pour la cytologie ,en pratique le pouvoir séparateur obtenu est de l'ordre de 01nm (10A°) , 200 fois supérieur à celui du microscope photonique ,permettant ainsi de pousser l'exploration au niveau des ultra structure cellulaire .
La lumière est remplacée par des électrons émis par une cathode (filament de tungstène) et accélérés dans le vide par une forte différence de potentiel (40000 à 100000 volts pour un microscope normal à bas voltage, 2 à 3 millions de volts pour un microscope à haut voltage)
-le faisceau d'électrons ne peut traverser les objets que d'une extrême minceur (50 à 80nm ce qui représente 400 coupes environ dans une cellule de 20µ de diamètre)
Le TEM a permis de préciser la structure de tous les organites cellulaires , de certaines macromolécules(ADN , ARN), comme il a mis en évidence l'uniformité qui existe dans le monde vivant au niveau des structures cellulaires .


microscope électronique

B 2 – <u>microscopes à balayage</u> (SEM)
Plus récemment mis au point, un faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon préalablement métallisé, le faisceau d'électrons est réfléchi (ne pénètrent pas dans l'échantillon)
Il peut parcourir de grands champs d'observation et étudier la surface d'échantillons massifs, d'où la vue tridimensionnelle des surfaces cellulaires.

02 - Aspect constitution physicochimique

a – microsonde électronique : frappés par un faisceau d'électrons, les objets émettent des rayons X, dont la longueur d'onde est caractéristique des atomes bombardés, les spectrographes détectent et mesurent ces longueurs d'ondes et permettent de déterminer la composition chimique de volume extrêmement petit de matière ($1\mu^3$). Il est possible ainsi de réaliser dans le même temps l'étude morphologique et l'analyse chimique d'une structure.



microsonde E

b – la cytochimie : la méthode consiste à immobiliser (fixer) la substance dans son site original, et à l'identifier par une technique spécifique à l'aide de réaction chimique.
Les colorants acides se fixent sur les substances basiques, les colorants basiques sur les substances acides. (Ex : basophilie du réticulum endoplasmique granulaire riche en acide ribonucléique)

c – le fractionnement cellulaire : il permet de séparer les différents organites cellulaires, elle s'effectue en deux étapes principales :
- le broyage d'un fragment de tissu qui s'effectue à 0°C en milieu isotonique tamponné, ce qui permet d'obtenir un homogénat dans lequel sont dispersés les constituants cellulaires .
- la centrifugation de l'homogénat pour isoler les différents constituants cellulaires.

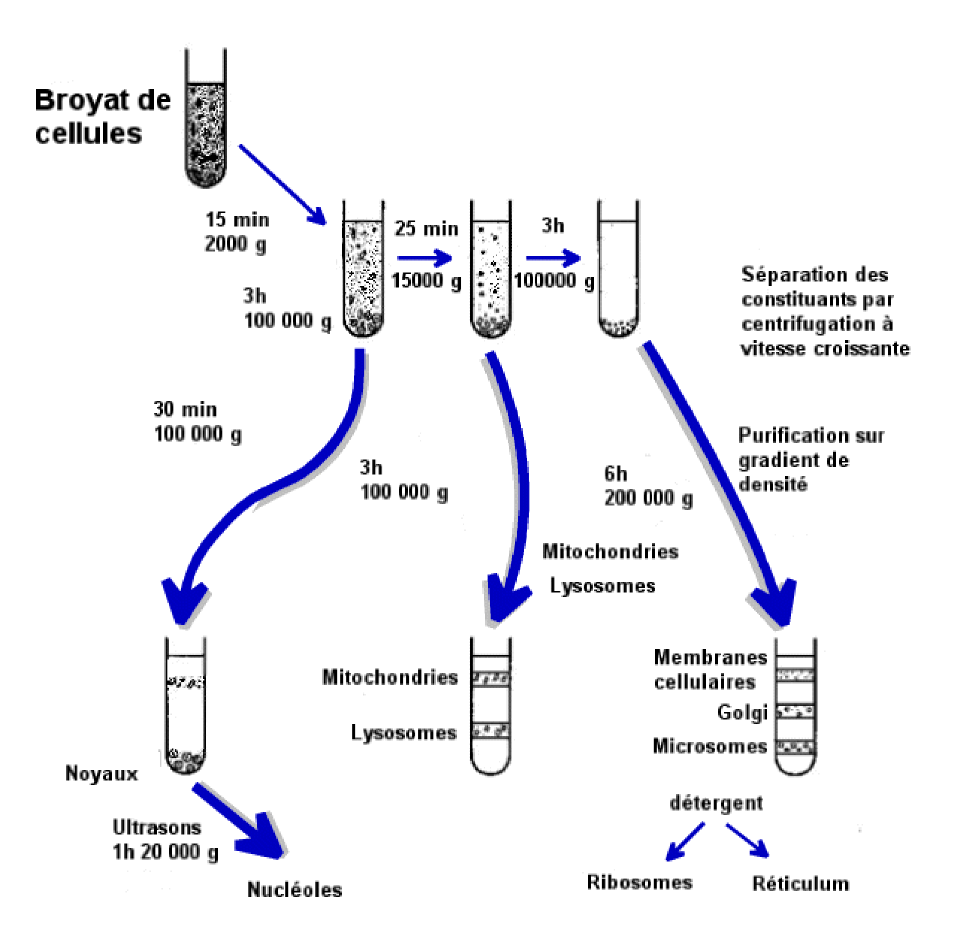
d – diffraction aux rayonnement (rayons x)
Est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction n'ayant lieu que sur la matière cristalline, on parle aussi de **radiocristallographie**. Pour les matériaux non-cristallins, on parle de diffusion
Cette méthode utilise un faisceau de rayons X qui rencontre la matière provoquant la dispersion du faisceau lumineux dans des directions spécifiques. Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons réfractés, il est possible d'obtenir une image tridimensionnelle de la densité électronique dans le cristal. À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal peut être déterminée, ainsi que leurs liaisons chimiques,



03 – aspect fonction (le fonctionnement de la cellule)
Ces méthodes peuvent être utilisées in vivo (sur l'animal vivant) ou in vitro (sur fragment de tissu ou sur cellules maintenus vivants en culture)
a- culture in vitro : elle permet d'isoler un tissu ou des cellules vivantes de l'organisme, et étudier leur comportement dans des conditions expérimentales modifiables à volonté.

b- la microchirurgie : par l'intermédiaire d'un micromanipulateur cette méthode permet d'effectuer une série d'interventions directes (ablation, greffes)

c- l'autoradiographie : elle permet de déterminer :-le site de synthèse d'une molécule
-la cinétique de cette molécule au cours de la vie cellulaire. Et ça en utilisant de précurseurs du métabolisme marqués avec des isotopes radioactifs. Ces précurseurs marqués sont incorporés par les cellules au même titre que les précurseurs naturels, ils sont ensuite localisés au niveau des molécules néo synthétisées.



<u>LE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>

LA MEMBRANE PLASMIQUE

A – définition : la membrane plasmique ou plasmalemme est une fine enveloppe entourant individuellement toutes les cellules (eucaryotes et procaryotes), ainsi que les endomembranes (celles des organites cellulaires à l'exception du centre cellulaire et des ribosomes).
Sa fonction fondamentale est de délimiter le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire et de maintenir la différence indispensable entre le contenu d'une cellule et son environnement elle agit comme un filtre de très grande sélectivité.
B – structure : fixée par les méthodes conventionnelles en microscopie électronique la membrane plasmique révèle sa structure en triple feuillet, deux couches hydrophiles disposées de part et d'autre d'une couche hydrophobe.
L'épaisseur totale de la membrane plasmique varie faiblement autour de 7,5nm suivant le type cellulaire.
L'épaisseur de chacun des deux feuillets osmiophile atteint 2nm, tandis que celle du feuillet osmiophobe (médian, claire) mesure 3,5nm.
Une asymétrie soulignée sur le coté externe par la présence du **cell coat**, formé de fibrilles d'un diamètre de 1,5nm, se dispose perpendiculairement à la surface de la membrane, son épaisseur diffère en fonction de la cellule.

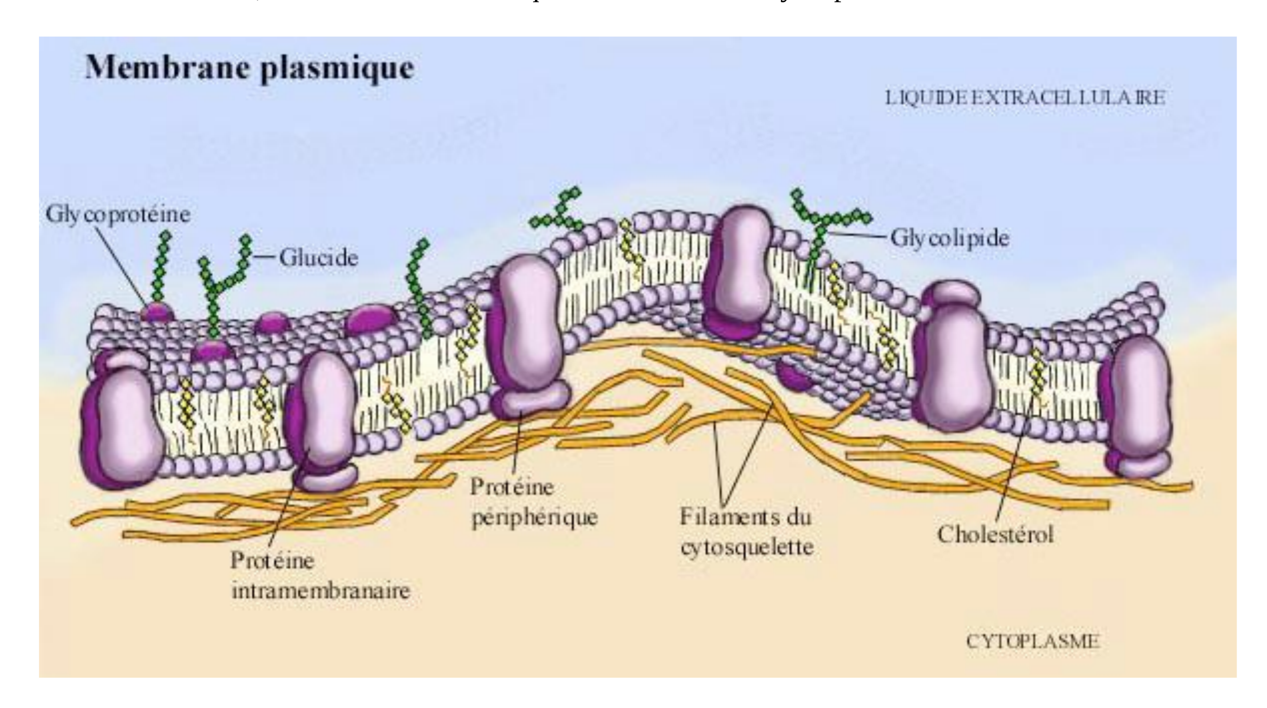
C - Architecture moléculaire de la membrane plasmique :
Plusieurs modèles ont été proposés depuis les premières observations en microscopie électronique
1- le modèle lamellaire : proposé en 1936 par Danieli et Dawson , selon ce modèle la membrane serait formée de deux feuillets phospholipidiques (pôles hydrophobes en regard , pôles hydrophiles orientés vers les faces internes et externes de la membrane) recouverts d'un film continu de protéines d'où le terme « sandwich lipoprotéique »
Or ce modèle n'explique pas le passage de l'eau et les substances non liposolubles

2- le modèle micellaire : proposé par Kavanau en 1964
A été envisagé pour expliquer l'aspect granulaire des membranes fréquemment observé au microscope électronique, car dans certaines conditions de préparation des échantillons les membranes apparaissent constituées de globules (micelles) de 4nm environ de diamètre, juxtaposés, ménageant entre eux des pores de 4A°-0,4nm
Selon ce modèle la membrane serait formée d'un film continu de sous unités globulaires (micelles) constituées de lipides ou lipoprotéines enrobées dans un ciment de glycoprotéines, mais ces aspects observés au microscope électronique sont instantanés, tout dépend des conditions physiologiques ou expérimentales.

3- le modèle en mosaïque fluide : proposé par Singer et Nicolson en 1972
Assimile la structure des membranes à celle d'une mosaïque constituée de protéines globulaires insérées dans la couche bimoléculaire de phospholipides.
- un double feuillet de lipides : réalise une barrière presque imperméable aux molécules hydrosolubles.
Les groupes polaires des lipides occupent la face externe (feuillet externe osmiophile) et la face interne (feuillet interne osmiophile)
Les groupes apolaires se situent dans le feuillet médian osmiophobe, leurs chaînes carbonées se dirigent perpendiculairement à la surface des deux feuillets dans l'espace qui sépare les groupes polaires.

- des protéines membranaires intrinsèques : (protéines transmembranaires)
Environ 70% des protéines membranaires, elles sont fortement liées à la membrane, occupent tout ou partie de son épaisseur, elles se caractérisent par leur amphipathie (elles possèdent deux pôles hydrophiles (extra et intra cellulaire) et une partie moyenne hydrophobe)
La presque totalité de ces protéines portent des chaînes polysaccharidiques, plus ou moins ramifiées ou longues, ce qui donne le **cell coat**, région la plus externe de la membrane plasmique.

- des protéines membranaires extrinsèques : (protéines périphériques)
Environ 30% des protéines membranaires, faiblement associées à la surface externe ou interne par des liaisons covalentes, des forces électrostatiques ou des liaisons hydrophobes.



D - Composition chimique des membranes biologiques :

L'isolement des membranes plasmiques des hématies par les techniques d'ultracentrifugation permet d'étudier la composition biochimique avec précision à cause de l'absence de débris d'organites.
Les différentes étapes d'isolement :

- les hématies placées dans un milieu hypotonique.
- L'eau pénètre par le phénomène d'osmose, l'hématie se distend, se gonfle, et subit une hémolyse (se vide).
- Obtention de culot pur ne contenant que des membranes plasmiques.

L'analyse chimique des membranes révèle une certaine constance de constitution : **eau** – **lipides** – **protéines** – **glucides**.
Leur pourcentage présente des variations liées aux types membranaires et cellulaires étudiés.
Exemple 01 : la membrane des hématies humaines contient : 52% de protéines, 40% lipides, 8% de sucres.
Exemple 02 : la gaine de myéline contient : 20% de protéines, 80% de lipides.
Ces variations reflètent les différences de fonction de ces membranes en effet la membrane des hématies assure le passage des gaz dans les deux sens, alors que la gaine de myéline isole les fibres nerveuses, assurant sans fuite la transmission de l'influx nerveux.

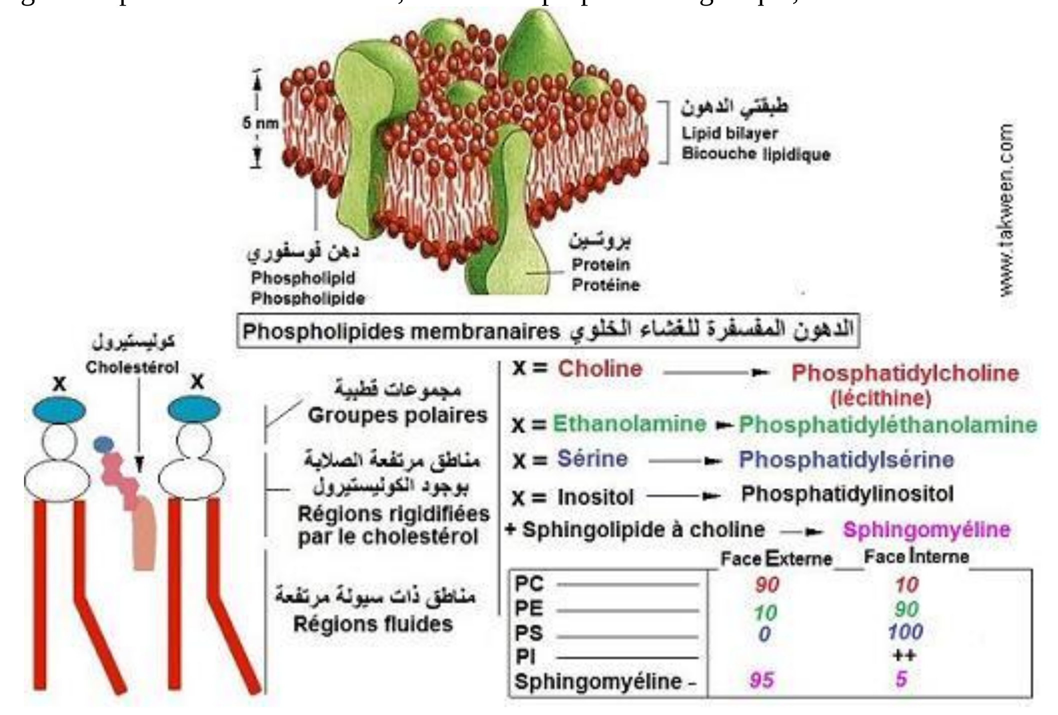
Pour la membrane plasmique le rapport protéines/lipides (en poids sec) est généralement voisin de **1**.

E - Constituants de la membrane plasmique :

I – les lipides membranaires : les lipides membranaires diffèrent largement entre eux, parmi les plus représentés :
01- les phospholipides : forment la classe la plus nombreuse mais présente une très grande hétérogénéité liée à la nature de leur groupe polaire hydrophile et de leurs deux chaînes aliphatiques (14 à 24 atomes de carbone) hydrophobes saturées ou insaturées du fait de la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons conditionnant la fluidité membranaire.

02 – le cholestérol : dans les membranes des cellules eucaryotes, il existe une molécule de cholestérol pour une molécule de phospholipides. La modification de cette proportion peut changer la fluidité de la membrane plasmique, car il augmente la stabilité mécanique par interaction avec les phospholipides et qui prévient la cristallisation en empêchant la confluence des chaînes aliphatiques.

03 – les glycolipides : résultent de l'association d'un sucre (en général le galactose) avec un acide gras de poids moléculaire élevé, ils ont une propriété antigénique, ils sont des sites de reconnaissance.



I- I -propriétés des lipides :

a – le réticulum endoplasmique synthétise les molécules de la membrane plasmique au moment de la synthèse, la future double couche lipidique de la membrane acquiert une structure asymétrique. Une répartition particulière des lipides se produit entre le feuillet externe et le feuillet interne.

Le feuillet externe contient surtout des glycolipides, le feuillet interne des phospholipides. C'est l'asymétrie nécessaire de la double couche lipidique

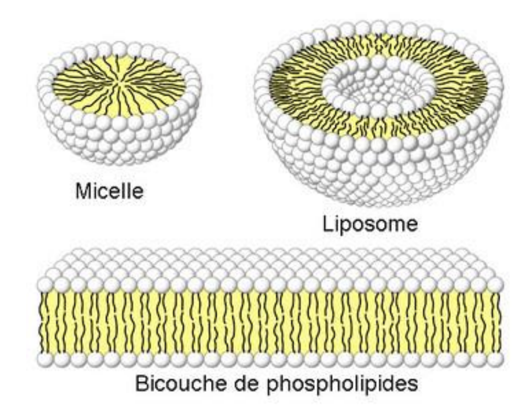
b – la tête polaire d'une molécule de phospholipides regroupe : la choline – un phosphate – le glycérol.

De cette extrémité polaire se dégagent deux queues, des chaînes hydrocarbonées (chaînes aliphatiques) saturées (CH2-CH2-CH2…………..) ou insaturées (CH2-CH=CH-CH2……..)

Contenant entre 14 et 24 atomes de carbone.

Aliphatique : se dit des corps organiques acycliques.

c – dans une suspension aqueuse de lipides, les groupes polaires entrent en contact avec l'eau, trois types de structure peuvent se former :



Micelle : une seule couche de lipides limite des sphères
Liposome : double couche de lipides limite des vésicules

I – II - Fonction des lipides membranaires

* <u>rôle des lipides dans la fluidité de la membrane plasmique</u> : l'architecture de la membrane n'est pas figée mais fluide, les variations de sa fluidité dépendent de :

- la présence ou l'absence de doubles liaisons dans la chaîne aliphatique, en effet l'instauration des chaînes hydrocarbonées augmente la fluidité, la saturation la rend visqueuse. Donc la quantité de doubles liaisons détermine le degré de fluidité de la membrane.
- le cholestérol renforce la solidité de la membrane, cette molécule possède un groupement polaire qui se place entre les groupements polaires des autres molécules lipidiques, et un noyau stéroïde qui s'intercale dans la zone des chaînes aliphatiques, il immobilise les chaînes voisines et assure la stabilité mécanique.
- une baisse de température provoque la synthèse de lipides membranaires insaturés, induisant ainsi une augmentation de la fluidité.

* <u>rôle des glycolipides</u> : ont une propriété antigénique, sont des sites de reconnaissance
Exemple : hexaglycosylceramide est un déterminant du groupe sanguin B.

I – III – mobilité des lipides

* <u>mouvement de déplacement</u> : la vitesse de déplacement des molécules lipidiques dans la membrane plasmique dépend de la longueur des chaînes aliphatiques, la présence ou l'absence des doubles liaisons et du sens de déplacement de la molécule.

- vitesse rapide : chaînes courtes et insaturées, déplacement latéral.
- mouvement lent : chaînes longues et saturées
- mouvement très lent : déplacement d'une couche à une autre (mouvement de flip-flop)

* <u>mouvement de flexibilité</u> : la flexibilité des molécules non saturées dépend de la faible rigidité des doubles liaisons.
Rappelons que la fluidité de la membrane augmente en fonction du degré d'instauration des lipides, comme elle dépend de la quantité de cholestérol inter membranaire (son augmentation provoque un accroissement de la rigidité membranaire.

<u>II - Les protéines membranaires</u> :

II - I – propriétés des protéines membranaires : sont moins nombreuses que les lipides (50molecules de lipides pour une protéine) P/L =1
De très grande taille, le poids moléculaire varie entre 20000 et 215000d (30 à 50 fois plus volumineuses que les lipides.

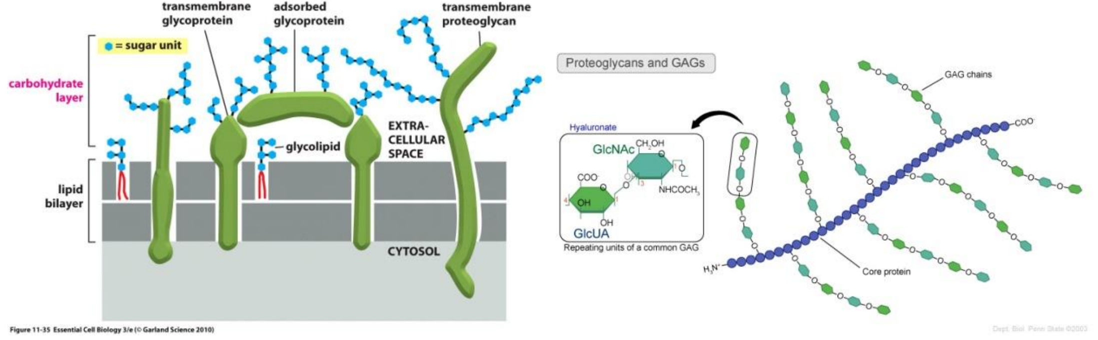
Elles représentent 50% de la masse de la membrane.
Elles ne présentent pas de pôles mais deux extrémités, une extrémité amino-terminale (NH2), l'autre carboxy-terminal (COOH)
Elles sont amphiphiles : Tout au long de la protéine alternent des zones tantôt hydrophile, tantôt hydrophobe, en fonction de la nature des acides aminés qui la constituent.
La majorité des protéines 70% se lie aux phospholipides hydrophobes, le reste 30% à d'autres molécules.
Elles sont multipotentielles : Toutes les protéines quelque soit leur localisation changent de forme suivant les conditions de l'environnement d'où l'origine de leur nom : Il dérive de protée (au latin : proteus) le dieu de la mer qui avait le don de prendre des formes variées.
Elles peuvent se déformer (Dans l'eau elles n'auront pas la même forme que dans un milieu hydrophobe).

<u>**Classification des protéines membranaires**</u> :
A – **protéines transmembranaires** : (protéines membranaires intrinsèques)
-ces protéines sont fortement liées aux lipides de la double couche
-elles traversent la membrane soit une seule fois = (protéines à traversée unique, petites de moins de 200 acides aminés elles agissent comme des récepteurs catalytiques) soit plusieurs fois= (protéines à traversée multiple, elles sont très longues contiennent plus de 900acides aminés placés bout à bout)

B- protéines membranaires périphériques :
- elles se fixent à la double couche lipidique uniquement par un lipide lié de façon covalente
- elles sont soit extracellulaires soit intracellulaires.

C- protéines membranaires glycosylées :
- elles ne se trouvent que dans la région extracellulaire.
- elles sont très riches en charges négatives (une charge tous les nano mètre)
- elles sont très rectilignes et ne se replient pas
- elles se classent en deux catégories : <u>les glycoprotéines</u> et les <u>protéoglycanes</u>

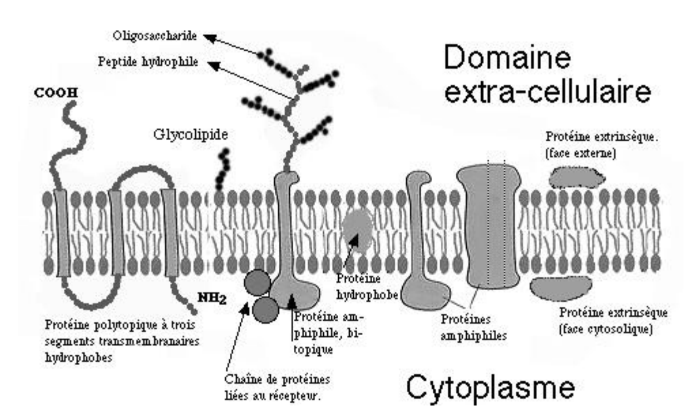
<u>Glycoprotéines</u> : formées par l'association de polysaccharides (heterosaccharides) avec une chaîne polypeptidique.
Le polysaccharide est formé d'une chaîne de 12 à 15 sucres, souvent ramifiée.
<u>Protéoglycanes</u> : association d'un polypeptide avec un polysaccharide non ramifié, formé par des polymères de disaccharide (séquence répétitive de deux sucres)



Molécule glycoprotéique : (Chaîne non polymérisée d'un hetérosaccharide)
molécule protéoglycanes : (Chaîne polymérique de disaccharide)
<u>**Fonction des protéines membranaires**</u> :

Les protéines interviennent en fonction de leur nature dans :
- le transport transmembranaire des substances nécessaire à la croissance et aux remplacements des structures cellulaires.
- la réception d'informations (Ex : hormone qui impose à la cellule une modification de son activité)
- les mécanismes de reconnaissance cellulaire (Ex : les spermatozoïdes d'une espèce reconnaissent les ovules de la même espèce)

- les liaisons structurales qui unissent le cytosquelette à la membrane plasmique.
- la fixation de substances médicamenteuses, de virus, de toxines ou de cellules.
- l'adhésivité entre cellules ou sur un support conjonctif ou autre (Ex : nidation de l'ovule dans l'utérus)



Mobilité des protéines :
La mobilité des protéines est généralement moins grande que celle des lipides et dépend essentiellement de la fluidité de la phase lipidique.
La technique **d'hybridation somatique** a permis de montrer que les protéines se déplacent à l'intérieur des membranes.
Des cellules humaines et des cellules de souris placées dans un même milieu de culture, fusionnent en donnant des hetérocaryons.
L'emploi des anticorps fluorescents verts pour marquer les protéines de souris et rouges pour celles de l'homme, démontre que dans l'heterocaryon nouvellement formé, les points fluorescents verts et rouges se repartissent sur la totalité de la surface cellulaire, ce qui prouve que les protéines membranaires peuvent se déplacer latéralement de plusieurs microns.

